

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2005 年 4 月 28 日 (28.04.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/037268 A1(51) 国際特許分類: A61K 31/203, 9/51,
9/06, 9/70, 7/00, 7/48, A61P 17/00, 3/02

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/013181

(22) 国際出願日: 2003 年 10 月 15 日 (15.10.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社 LTT バイオファーマ (LTT BIO-PHARMA CO., LTD.) [JP/JP]; 〒105-6201 東京都港区愛宕 2 丁目 5 番 1 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 山口 葉子 (YAMAGUCHI, Yoko) [JP/JP]; 〒258-0022 神奈川県足柄

上郡開成町牛島 2 7-1 7 Kanagawa (JP). 五十嵐 理慧 (IGARASHI, Rie) [JP/JP]; 〒214-0036 神奈川県川崎市多摩区南生田 5 丁目 8-2 Kanagawa (JP). 水島 裕 (MIZUSHIMA, Yutaka) [JP/JP]; 〒106-0032 東京都港区六本木 6 丁目 1 2-3-2 4 0 2 Tokyo (JP). 武永美津子 (TAKENAGA, Mitsuko) [JP/JP]; 〒216-0015 神奈川県川崎市宮前区菅生 2 丁目 3 0-1 Kanagawa (JP). 中村 なつみ (NAKAMURA, Natsumi) [JP/JP]; 〒216-0005 神奈川県川崎市宮前区土橋 7 丁目 1-5-1 1 1 Kanagawa (JP).

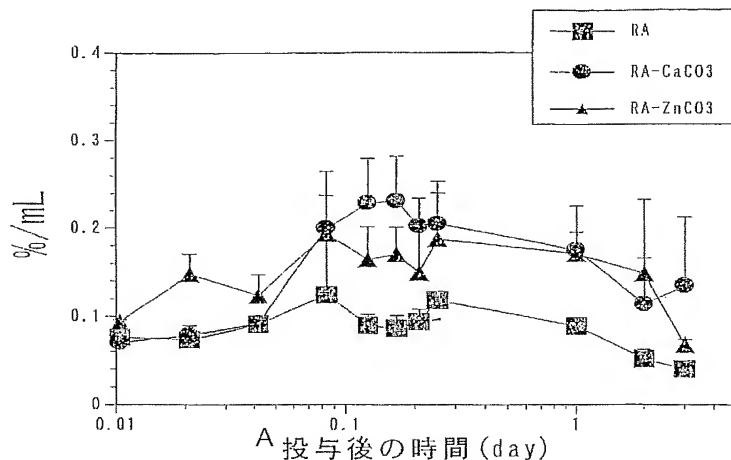
(74) 代理人: 草間 攻 (KUSAMA, Osamu); 〒102-0072 東京都千代田区飯田橋 4 丁目 5 番 1 2 号 岩田ビル 7 階 草間特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,

/ 続葉有 /

(54) Title: COMPOSITION CONTAINING RETINOIC ACID NANOPARTICLES COATED WITH POLYVALENT METAL INORGANIC SALT

(54) 発明の名称: 多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子含有組成物



A... TIME (DAYS) AFTER ADMINISTRATION

(57) Abstract: It is intended to provide a composition containing, as the active ingredient, retinoic acid nanoparticles having relieved irritation, which can be subcutaneously and intravenously administered, is usable as a sustained release preparation, and has such a high skin-permeability as allowing the use thereof as an external preparation such as a drug or a quasi drug as well as a cosmetic to be applied to the skin, etc. When dissolved in water, the retinoic acid nanoparticles coated with a polyvalent metal inorganic salt, i.e., the active ingredient, are maintained in the form of a transparent solution and, therefore, can be administered as a subcutaneous or intravenous injection. Since retinoic acid is coated with a polyvalent metal inorganic salt film, these nanoparticles are characterized by showing relieved irritation and thus causing neither inflammation nor canceration at administration site. As the polyvalent metal inorganic salt, use is made of calcium carbonate, zinc carbonate or calcium phosphate.

/ 続葉有 /



WO 2005/037268 A1



LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),

OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約: 皮下投与および静脈内投与が可能であり、徐放性製剤としても使用でき、さらに皮膚透過性が高く、皮膚に塗布等をする医薬品および医薬部外品としての外用剤および化粧品にも使用できる、刺激性が低減されたレチノイン酸のナノ粒子を有効成分として含有する組成物を提供する。本発明の有効成分である多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子は、水に溶解した場合には透明溶液の形態を保っているため、皮下および静脈内注射製剤として投与することが可能となる。また、多価金属無機塩の皮膜によりレチノイン酸が被覆されていることから低刺激性であり、投与部位における炎症の発生、腫瘍化などがみられない特性を有している。その多価金属無機塩としては、炭酸カルシウム、炭酸亜鉛またはリン酸カルシウムである。

明細書

多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子含有組成物

5 技術分野

本発明は、有効成分として、多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子、特に多価金属無機塩として、炭酸カルシウム、炭酸亜鉛またはリン酸カルシウムの皮膜を被覆したレチノイン酸ナノ粒子を有効成分として含有する組成物に関する。

詳細には、炭酸カルシウム、炭酸亜鉛またはリン酸カルシウムの皮膜を被覆した
10 レチノイン酸ナノ粒子を有効成分として含有する、経口投与製剤、非経口投与製剤、外用製剤、化粧品に関する。

背景技術

近年、脂溶性ビタミンA酸であるレチノイン酸のES細胞 (embryo stem cell :
15 胚幹細胞)を含む種々の未分化細胞における分化誘導作用が注目されてきており、また、レチノイン酸の急性前骨髄性白血病に対する治療薬としての臨床的利用がなされている。

しかしながら、レチノイン酸は分子内にカルボキシル基を有する化合物であることから刺激性があり、皮下投与した場合には炎症もしくは注射部位の腫瘍化が
20 認められ、また、脂溶性のために注射剤としての製剤化は困難なものである。したがってレチノイン酸については、種々の徐放化製剤、あるいはターゲット療法としてのドラッグデリバリー・システム (DDS) を応用した製剤化が検討されている [例えば、C. S. Cho, K. Y. Cho, I.K. Park, S. H. Kim, T. Sugawara, M. Uchiyama & T. Araiike: "Receptor-mediated delivery of all trans-retinoic acid
25 to hepatocyte using poly(L-lactic acid) nanoparticles coated with galactose-carrying polystyrene", J. Control Release, 2001 Nov. 9:77(1-2), 7-15]。

また、生分解性ポリマーを使用した注射製剤も提案されている [例えば、G. G. Giordano, M. FD. Refojo & M. H. Arroyo: "Sustained delivery of retinoic acid from microspheres of biodegradable polymer in PVR", Invest. Ophthalmol. Vis.,

1993 Aug. 34(9): 274-2745]。

さらにレチノイン酸は、上皮細胞増殖作用のため、皮膚のシワとり、皮膚の活性化・老化防止剤等として化粧品への応用が提案されている (Japanese Patent Laid-open Publication No. Hei 09-503499) が、カルボン酸としての性質のため、
5 刺激性が強く、炎症を起す等の問題点があり、現実の化粧品への使用は不可能である。

かかる現状を鑑み、本発明者等は先に、皮下および静脈内注射が可能であり、徐放性製剤として使用することができるとともに、また皮膚に塗布した場合にはレチノイン酸の有する効果を有効に発揮し得る、レチノイン酸含有のナノ粒子を提供している [例えば、特願 2 0 0 3 - 1 7 2 4 9 3 ; 薬剤学, Vol. 62 Mar. 2002, Supplement, 日本薬剤学会第 1 7 年会講演要旨集 ; Drug Delivery System (DDS), Vol. 18, No. 3 May. :221 (2003) ; 29th Annual Meeting of the Controlled Release Society in Collaboration with the Korean Society for Biomaterials; Final Program July 20-25 (2002)]。

15 先に提案しているレチノイン酸含有のナノ粒子は、レチノイン酸を少量の極性溶媒に溶解して、アルカリを含む水で分散させ、次に非イオン性界面活性剤を添加することより得られた混合ミセルに、2 価の金属塩を添加し、さらに 2 価の陰イオンをもつ塩を添加することにより調製されたものである。

かかるレチノイン酸含有のナノ粒子は、粒子表面に金属化合物の皮膜を形成してなるものであり、例えば 2 価の金属塩として塩化カルシウムを使用し、2 価の陰イオンをもつ塩として炭酸ナトリウムを使用した場合には、ナノ粒子表面に炭酸カルシウムの皮膜が形成されることとなる。

この本発明者等が先に提供しているレチノイン酸含有のナノ粒子は、レチノイン酸の両親媒性を利用して調製したものである。すなわち、レチノイン酸を水溶液中に分散させることにより、一旦球状ミセルに形成させ、ミセル表面をマイナス荷電に覆われた状態とする。次いで、非イオン界面活性剤を添加し、さらに塩化カルシウムを添加することにより、ミセル表面のマイナス荷電にカルシウムイオン (Ca^{2+}) を吸着させ、レチノイン酸のミセル同士の凝集・沈澱を防ぐことによりミセル表面がカルシウムイオンで覆われた球状、もしくは卵形等を有する

ミセルとする。さらに炭酸ナトリウムを添加して、炭酸イオン (CO_3^{2-}) をミセル表面のカルシウムイオンに吸着 (結合) させて、ミセル表面荷電を完全に中和させる。その結果、レチノイン酸のミセル表面に炭酸カルシウム皮膜が形成され、炭酸カルシウム被覆レチノイン酸ナノ粒子が調製される。

- 5 ところで一般的に、沈澱法または均一沈澱法で形成される炭酸カルシウム結晶は、通常カルサイトと呼ばれる水に対しての溶解性が殆どない結晶である。しかしながら、上記の方法でミセル表面に形成される炭酸カルシウムは、球状、もしくは卵形等を有する曲率をもつミセル表面に形成されていることより、硬い結晶構造をとりにくい。したがって、形成された炭酸カルシウム層は、いわゆるガラス構造を有するアモルファスもしくは準安定相であるバテライト構造を有している。
- 10 炭酸カルシウム皮膜がアモルファスである場合は、硬い結晶構造でないことから、水への溶解性が高く、生分解性が向上し、容易に分解される。またバテライトを形成した場合は、一般に、炭酸カルシウムの他の結晶構造であるカルサイトあるいはアラゴナイトに比較して水への溶解度が高いため、容易に生分解される。
- 15 る。

その結果、上記で得られた炭酸カルシウム被覆レチノイン酸ナノ粒子を生体内に投与等した場合には、ミセル表面の炭酸カルシウム皮膜層が容易に分解し、含有されているレチノイン酸が放出され、その結果、薬効を徐放的に発揮するものである。

- 20 レチノイン酸のミセル表面を金属化合物で被覆する場合には、上記した炭酸カルシウムのみならず、生体適合性を有する、例えば炭酸亜鉛、リン酸カルシウム等の多価金属無機塩であっても、同様の効果を発揮するものである。

しかしながら、上記のようにして形成された炭酸カルシウムをはじめとする多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子は、5 ~ 1000 nm 程度の粒子径 (直径) を有するものであって、所望の粒子径を有するナノ粒子を効率よく調製することができていない。特に、レチノイン酸を皮下あるいは静脈内投与する場合、または皮膚投与 (塗布投与等) し、経皮吸収させる場合にはその粒子径は5 ~ 3000 nm 程度の極めて微細なナノ粒子であることが好ましい。

25

したがって本発明は、炭酸カルシウムをはじめとする多価金属無機塩被覆レチ

ノイン酸ナノ粒子について、その粒径を5～300nm程度の極めて微細なナノ粒子とし、かかるナノ粒子を有効成分として含有する、皮下あるいは静脈内投与としての製剤、または外用剤、化粧品として皮膚適用（塗布投与等）し得る組成物を提供することを課題とする。

- 5 かかる課題を解決するために、本発明者等は鋭意検討した結果、レチノイン酸のミセル表面に多価金属無機塩の皮膜を形成させる段階で、当該ミセルに添加させる金属ハロゲン化物とアルカリ金属炭酸化物またはリン酸化物のモル比を適宜調整することにより、平均粒子径が5～300nm程度の粒径を有する多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子を調製し得ることを新規に見出し、本発明を完
- 10 成させるに至った。

発明の開示

したがって本発明は、基本的態様として、

- 15 (1) 有効成分として、レチノイン酸のミセル表面を多価金属無機塩で被覆してなる平均粒子径が5～300nmを有する多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子を含有することを特徴とする組成物；
- 20 (2) 有効成分である多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子における多価金属無機塩の皮膜が、炭酸カルシウム、炭酸亜鉛またはリン酸カルシウムである上記(1)に記載する組成物；
- 25 (3) 有効成分である多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子が、レチノイン酸の低級アルコール溶液をアルカリ水溶液と共に分散し、さらに非イオン性界面活性剤を添加することにより調製した混合ミセルに、2価金属ハロゲン化物または酢酸化物と、アルカリ金属炭酸化物またはリン酸化物を、モル比で1：0～1.0の範囲内で添加することによりミセル表面に多価金属無機塩の皮膜を形成し、その平均粒子径を5～300nmの範囲内に調整することにより得られたものである上記(1)または(2)に記載する組成物；
- (4) 有効成分が、平均粒子径が5～300nmを有する炭酸カルシウム被覆レチノイン酸ナノ粒子である上記(1)、(2)または(3)に記載する組成物；
- (5) 有効成分が、平均粒子径が5～300nmを有する炭酸亜鉛被覆レチノイ

- ン酸ナノ粒子である上記（１）、（２）または（３）に記載する組成物；
- （６）有効成分が、平均粒子径が５～３００ｎｍを有するリン酸カルシウム被覆
レチノイン酸ナノ粒子である上記（１）、（２）または（３）に記載する組成物；
- （７）組成物が、経口投与製剤、非経口投与製剤、外用製剤、化粧品である上記
5 する（１）ないし（６）に記載する組成物；
- （８）組成物が、徐放性である上記（７）に記載する組成物；
- である。

したがって、本発明の具体的な態様としては、

- （９）有効成分として、平均粒子径が５～３００ｎｍを有する炭酸カルシウム被
10 覆レチノイン酸ナノ粒子を含有することを特徴とする徐放製剤；
- （１０）有効成分として、平均粒子径が５～３００ｎｍを有する炭酸カルシウム
被覆レチノイン酸ナノ粒子を含有することを特徴とする外用剤；
- （１１）平均粒子径が５～３００ｎｍを有する炭酸カルシウム被覆レチノイン酸
ナノ粒子を配合してなる化粧品；
- 15 （１２）有効成分として、平均粒子径が５～３００ｎｍを有する炭酸亜鉛被覆レ
チノイン酸ナノ粒子を含有することを特徴とする徐放製剤；
- （１３）有効成分として、平均粒子径が５～３００ｎｍを有する炭酸亜鉛被覆レ
チノイン酸ナノ粒子を含有することを特徴とする外用剤；
- （１４）平均粒子径が５～３００ｎｍを有する炭酸亜鉛被覆レチノイン酸ナノ粒
20 子を配合してなる化粧品；
- （１５）有効成分として、平均粒子径が５～３００ｎｍを有するリン酸カルシウ
ム被覆レチノイン酸ナノ粒子を含有することを特徴とする徐放製剤；
- （１６）有効成分として、平均粒子径が５～３００ｎｍを有するリン酸カルシウ
ム被覆レチノイン酸ナノ粒子を含有することを特徴とする外用剤；
- 25 （１７）平均粒子径が５～３００ｎｍを有するリン酸カルシウム被覆レチノイン酸
ナノ粒子を配合してなる化粧品；
- である。

本発明が提供する組成物における有効成分である多価金属無機塩被覆レチノイ

ン酸ナノ粒子は、その平均粒子径が5～300nmの範囲内の極めて微細なものである。

レチノイン酸が皮下投与された場合には、その高い刺激性と脂溶性のため、投与部位に炎症もしくは腫瘍化が認められる。また水に不溶であることから、注射剤としては不向きであった。本発明が提供する多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子は、水に溶解した場合には透明溶液の形態を保っているため、皮下および静脈内注射製剤として投与することが可能となる。また、生体適合性の多価金属無機塩の皮膜によりレチノイン酸が被覆されていることから低刺激性であり、投与部位における炎症の発生、腫瘍化などがみられない特性を有する。

さらに、本発明のナノ粒子を外用剤として皮膚に塗布投与した場合には、良好に経皮吸収され、刺激性がないことから炎症を惹起せず、ナノ粒子から徐放的にレチノイン酸が放出され、皮膚のシワとり、活性化等の効果を発揮できるのである。

特にレチノイン酸を皮膚に塗布した場合には、上皮細胞の増殖をもたらし、新たな皮膚再生に極めて効果的なものであり、美白、シワとりに効果的な化合物であるが、これまで皮膚刺激性のため化粧料としての適用はなされていなかった。しかしながら、多価金属無機塩を被覆したナノ粒子としたことにより、刺激性を低減し、また平均粒子径が5～300nmと微細なものであることから、皮膚浸透性が向上し、レチノイン酸の血中動態が上昇し、短時間のうちにレチノイン酸が血中に存在し、また徐放的に長時間に亘って、血中濃度を維持し得る利点を有している。

その結果、上皮細胞の増殖因子であるHB-EGF (HB-Epidermal Growth Factor) の産生量が上昇し、また、表皮内では通常短時間で産生されないヒアルロン酸の産生が誘導されることから、皮膚再生が早まることとなり、表皮の肥厚が顕著に認められる特性を有し、したがって、化粧料への適用ばかりでなく、再生医療への応用として、極めて有用なものである。

図面の簡単な説明

第1図は、試験例4における、メラノーマ細胞のレチノイン酸刺激による³H

ーチミジン取り込み量を示す図である。

第2図は、試験例5の(1)における、レチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子およびレチノイン酸ミセルをラットに皮下投与した場合の血中放出レチノイン酸濃度の推移を示した図である。

- 5 第3図は、試験例5の(1)における、比較例であるナノ粒子化しないレチノイン酸ミセルをラットに投与し、その投与後10日後の皮下投与部位の写真である。

第4図は、試験例5の(1)における、本発明のレチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子をラットに皮下投与し、その投与後10日後の皮下投与部位の写真である。

- 10 第5図は、試験例5の(2)における、レチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子、レチノイン酸- ZnCO_3 ナノ粒子およびレチノイン酸をワセリン基剤に混合しマウスの皮膚に塗布投与した場合の血中放出レチノイン酸濃度の推移を示した図である。

第6図は、試験例6における、HB-EGF mRNA産生量の比較を示した図である。

- 15 第7図は、試験例7における、各製剤を投与した時の表皮の厚さの結果を示した図である。

第8図は、試験例7における、コントロールとして無処理群の皮膚組織の染色(HE染色)写真である。

- 20 第9図は、試験例7における、レチノイン酸単独含有製剤投与群の皮膚組織の染色(HE染色)写真である。

第10図は、試験例7における、レチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子含有製剤投与群の皮膚組織の染色(HE染色)写真である。

第11図は、試験例7における、レチノイン酸- ZnCO_3 ナノ粒子含有製剤投与群の皮膚組織の染色(HE染色)写真である。

- 25 第12図は、試験例7における、レチノイン酸-Caナノ粒子含有製剤投与群の皮膚組織の染色(HE染色)写真である。

第13図は、試験例7における、レチノイン酸-Znナノ粒子含有製剤投与群の皮膚組織の染色(HE染色)写真である。

第14図は、試験例7における、レチノイン酸単独含有製剤投与群の皮膚組織

の染色（コロイド鉄染色）写真である。

第15図は、試験例7における、レチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子含有製剤投与群の皮膚組織の染色（コロイド鉄染色）写真である。

5 第16図は、試験例8における、投与開始前のヘアレスマウスの首部の写真である。

第17図は、試験例8における、レチノイン酸単独含有製剤および本発明のレチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子含有製剤を4日間塗布したヘアレスマウスの首部の写真である。

10 第18図は、試験例9における、レチノイン酸単独含有製剤における極大吸収の変化を示したグラフである。

第19図は、試験例9における、レチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子水媒体製剤における極大吸収の変化を示したグラフである。

第20図は、試験例9における、レチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子ワセリン基剤製剤における極大吸収の変化を示しグラフである。

15 なお、図中において、RAはレチノイン酸を、 $\text{RA}-\text{CaCO}_3$ はレチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子を、 $\text{RA}-\text{ZnCO}_3$ はレチノイン酸- ZnCO_3 ナノ粒子を、 $\text{RA}-\text{Ca}$ はレチノイン酸-Caナノ粒子を、 $\text{RA}-\text{Zn}$ はレチノイン酸-Znナノ粒子を意味する。

20 発明を実施するための最良の形態

本発明で使用するレチノイン酸は、生理学的には、視覚、聴覚、生殖などの機能保持、成長促進、皮膚や粘膜などの正常保持、制ガン作用等を有し、急性前骨髄球性白血病（APL: acute promyelocytic leukemia）の治療薬として臨床的に使用されている全トランス体レチノイン酸（*all-trans* retinoic acid）である。

25 この多価金属無機塩を被覆したレチノイン酸のナノ粒子の調製は、詳細には以下のようにして行われる。

レチノイン酸は、脂溶性化合物であり、また分子内にカルボン酸を有していることから、アルカリ水溶液、例えば水酸化ナトリウム水溶液および少量の低級アルコールを添加することにより、水溶液中で球状のミセルが形成される。このミ

- セルの表面は、マイナス荷電で覆われた状態となっているため、容易に2価金属イオン、たとえばカルシウムイオン (Ca^{2+}) が吸着 (結合) し、ナトリウムイオンとの交換反応が生じる。この場合、2価金属イオンはナトリウムイオンに比較して吸着力 (結合力) が高いことから、2価金属イオンを吸着したミセルは、
- 5 その表面の荷電は解離しにくくなり、水に不溶化して、ミセルは沈殿する。沈殿を生じると、粒子同士の凝集が生じ、非常に大きな粒子を形成することとなる。

したがって、この段階での粒子同士の凝集を防ぐために、非イオン性界面活性剤、例えば、ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノオレート (Tween 80) をレチノイン酸と共に添加する。すなわち、Tween 80 は、レチノイン酸と共に混

10 合ミセルを形成し、ミセル表面上にポリオキシエチレン鎖を突出させているため、多価金属イオンがミセル表面に吸着 (結合) しても、ミセル表面に突出した親水基としてのポリオキシエチレン鎖の存在により、ミセルの沈殿が生じないこととなる。

- 次いで、2価金属ハロゲン化物または酢酸化物、例えば塩化カルシウムを添加
- 15 する。この場合の2価金属ハロゲン化物の添加量は、レチノイン酸のミセル表面に2価金属イオンを吸着させるに十分な量であればよい。2価の金属イオンはナトリウムイオンより吸着力 (結合力) が強く、ナトリウムイオンとの交換が生じる。その結果、2価金属イオンが優先的に吸着 (結合) することとなり、ミセル表面が2価金属イオンで覆われた球状もしくは卵形等のミセルが形成される。そこ
- 20 こに、さらにアルカリ金属炭酸化物またはアルカリ金属リン酸化物を添加すると、ミセル表面電荷は完全に中和されていないために、さらに炭酸イオン (CO_3^{2-}) あるいはリン酸イオン (PO_4^{2-}) が表面にある2価金属イオンに吸着 (結合) する。この結果、レチノイン酸のミセル表面に多価金属無機塩の皮膜が形成されりこととなり、多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子が調製される。

- 25 かかる多価金属無機塩被覆ナノ粒子における多価金属無機塩としては、生体適合性を有する炭酸カルシウム、炭酸亜鉛またはリン酸カルシウムをあげることができる。

したがって、2価の金属ハロゲン化物または酢酸化物としては、カルシウムハロゲン化物、亜鉛ハロゲン化物、酢酸カルシウムまたは酢酸亜鉛であり、カルシ

ウムハロゲン化物および亜鉛ハロゲン化物としては、具体的には、塩化カルシウム、臭化カルシウム、フッ化カルシウム、ヨウ化カルシウム、塩化亜鉛、臭化亜鉛、フッ化亜鉛およびヨウ化亜鉛をあげることができる。

5 また、アルカリ金属炭酸化物またはアルカリ金属リン酸化物としては、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、リン酸ナトリウムおよびリン酸カリウムをあげることができる。

一方、ナノ粒子の調製に使用する低級アルコールとしては、メタノールあるいはエタノールをあげることができる。

10 また、非イオン性界面活性剤としては、例えば、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノオレート(Tween 80)、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート(Tween 20)、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノステアレート(Tween 60)、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノパルミテート(Tween 40)、ポリオキシエチレン(20)ソルビタントリオレート(Tween 85)、ポリオキシエチレン(8)オクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレン(20)コレステロールエステルおよびポリオキシエチレン硬化ヒマシ油をあげることができる。

20 以上の方法により調製された多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子は、微細なナノ粒子ではあるが、その粒度分布は幅広く、10~3000nm程度の粒子径(直径)を有するものであった。

ところで、多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子を皮下投与あるいは静脈内投与する場合、またさらに皮膚投与してレチノイン酸を経皮吸収させる場合には、その粒径は5~300nm程度の極めて微細なナノ粒子であることが好ましい。したがって目的とする多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子について、25 その粒径が5~300nm程度の極めて微細なナノ粒子に調整する必要がある。

かかる粒子径の調整は、レチノイン酸のミセルの表面に形成させるために添加する、2価金属ハロゲン化物または酢酸化物と、アルカリ金属炭酸化物またはリン酸化物のモル比を変化させ、かつ超音波処理等の機械的振動を与えることにより行い得ることが判明した。

すなわち、レチノイン酸のミセル表面への多価金属無機塩の皮膜の形成は、アルカリ（具体的にはナトリウム）水溶液中で形成されたミセルの表面のマイナス荷電を、2価金属ハロゲン化物または酢酸化物による2価金属イオン、例えばカルシウムイオン（ Ca^{2+} ）との交換反応、およびアルカリ金属炭酸化物あるいはリン酸化物による炭酸イオン（ CO_3^{2-} ）またはリン酸イオン（ PO_4^{2-} ）とによる中和で行われる。

具体的には、添加する2価金属ハロゲン化物または酢酸化物と、アルカリ金属炭酸化物あるいはリン酸化物の両者の比率を、モル比で1：0～1.0の範囲内で添加することにより、ミセル表面に多価金属無機塩の皮膜を形成し、所望により超音波処理等の機械的振動を加え、その平均粒子径を5～300nmの範囲内とすることが可能となった。

アルカリ金属炭酸化物あるいはリン酸化物を2価金属ハロゲン化物または酢酸化物1モルに対し1.0モルを超えて添加した場合には、ミセル表面上に多価金属無機塩の皮膜の形成は生じるものの、粒径が大きなものとなり、粒子同士の凝集が生じてしまい、超音波処理を加えても所望の平均粒子径を有するナノ粒子を得ることができず、好ましいものではない。

しかしながら、添加する2価金属ハロゲン化物または酢酸化物と、アルカリ金属炭酸化物またはリン酸化物との両者の比率を、モル比を1：0～1.0の範囲内で添加した場合には、ミセル表面に多価金属無機塩の皮膜が形成され、そのうえで平均粒子径を5～300nmの範囲内とすることが可能となったのである。

なお、得られたナノ粒子は凝集体として存在している場合もあり、この場合にはかかる凝集体を超音波処理等の機械的振動を与えることにより、極めて均一な平均粒子径を有するナノ粒子に調製し得ることが判明した。したがって、本発明のナノ粒子にはそのような凝集体をも包含する。

25

以上のようにして調製された本発明が提供する多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子は、水に溶解した場合に透明溶液の形態を保つものであり、多価金属無機塩の皮膜によりレチノイン酸が被覆されていることから低刺激性であり、皮下および静脈内注射製剤として投与することが可能となる。また、投与部位にお

ける炎症の発生、腫瘍化などがみられない。

さらに、外用剤として皮膚に塗布投与した場合には、良好に経皮吸収され、刺激性がないことから炎症を惹起せず、ナノ粒子から徐放的にレチノイン酸が放出され、皮膚のシワとり、活性化等の効果を発揮できるのである。

5

本発明が提供する組成物は、上記した多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子を有効成分として含有し、その特性を生かした、経口投与用製剤、非経口投与用製剤、外用製剤、化粧料としての組成物であり、また、レチノイン酸を徐放的に放出する徐放性の組成物である。

10 経口投与用製剤としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、シロップ剤等をあげることができる。また、非経口用製剤としては、注射剤（皮下注射、静脈内注射等）、点滴静注等の液剤、点眼剤、スプレー剤、噴霧剤等の経鼻、口腔用製剤等をあげることができる。さらに、外用剤としては、軟膏剤、クリーム剤、パップ剤等をあげることができる。

15 これらの製剤は、いずれも日本薬局方の「製剤総則」に記載の方法に準じ調製することができ、製剤化に用いられる担体、賦形剤、滑沢剤、流動化剤、崩壊剤、結合剤、等張化剤、安定化剤等としては、製剤学的に汎用されている各種のものを適宜選択して、使用することができる。

本発明が提供する組成物における有効成分である多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子の投与量は、一概に限定されない。一般的には、投与されるべき患者の性別、年齢、体重、その症状等により異なるが、レチノイン酸が有する薬理活性を発揮し、その効果が発現できる用量を投与すればよい。

本発明の組成物は、例えば、心筋梗塞、狭心症、脑梗塞を含む虚血性疾患治療薬として適用することができる。

25 一方、本発明が提供する化粧料としては、クリーム、乳液、ローション、洗顔料、パック等の基礎化粧品、口紅、ファンデーション等のメイクアップ化粧品等をあげることができる。化粧料における多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子の配合量も、一概に限定されず、適当な香料と共に使用してもよいし、また化粧料に用いられる適当な賦形剤、香料、色素をはじめとする油脂類、界面活性剤、

保湿剤、pH調整剤、増粘剤、防腐剤、酸化防止剤、紫外線吸収剤、顔料、洗浄剤、乾燥剤、乳化剤など、各種化粧品成分と共に適宜配合してもよい。

また、本発明が提供する組成物は、例えばステントやカニューレ等の医療用機材に塗布し適用することもできる。

5

以下に本発明を、各種試験例により詳細に説明する。

なお、本発明が提供する組成物における有効成分である多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子において、炭酸カルシウム被覆レチノイン酸ナノ粒子を「レチノイン酸-CaCO₃ナノ粒子」と、炭酸亜鉛被覆レチノイン酸ナノ粒子を「レチノイン酸-ZnCO₃ナノ粒子」と、またリン酸カルシウム被覆レチノイン酸ナノ粒子を「レチノイン酸-CaPO₄ナノ粒子」と記載する場合もある。

10

試験例1：レチノイン酸-CaCO₃ナノ粒子の作製

レチノイン酸13.6mgを900μLのエタノール（またはメタノール）に溶解し、この溶液に0.5N-NaOH水溶液の100μLを加えた。このときのpHは、7～7.5であった。この溶液を母液として100μL採取し、これをTween 80を含む蒸留水100μLに加え、よく攪拌した。

15

約30分後に、5M-塩化カルシウム含有水溶液を加え攪拌し、さらに30分後に1M-炭酸ナトリウム含有水溶液を加え、さらに攪拌した。一昼夜攪拌を継続した後、得られた溶液を一夜凍結乾燥し、目的とする炭酸カルシウム被覆レチノイン酸ナノ粒子を作製した。

20

この場合において、塩化カルシウムおよび炭酸ナトリウムのモル比を変化させてレチノイン酸のミセルに添加させることによりえられるレチノイン酸-CaCO₃ナノ粒子の製造直後の粒子径（直径）および5分間の超音波処理を施した後の粒子径（直径）は、下記第1表に記載のとおりであった。

25

第1表：ナノ粒子の粒径に及ぼす塩化カルシウムおよび炭酸ナトリウムの比率

	レチノイン酸-CaCO ₃ ナノ粒子の平均粒子径						
CaCl ₂ /NaCO ₃ のモル比	1/0	1/0.01	1/0.1	1/0.2	1/0.3	1/0.5	1/1.0
調製直後	20.2	23	17.3	30.3	356.3	1316.2	1450
超音波処理後	—	—	—	22.4	33.3	41.1	106.4

第1表に示した結果からも判明するように、塩化カルシウムおよび炭酸ナトリウムのモル比を調整し、レチノイン酸ミセルに添加することにより、レチノイン酸-CaCO₃ナノ粒子の粒径が調整されていることが理解される。

特に、塩化カルシウムおよび炭酸ナトリウムをモル比で1：0～0.2までの範囲内で添加することにより、レチノイン酸ミセルの表面に炭酸カルシウム皮膜を形成し、その粒径が10～50 nmの範囲内に調整されている。

また、塩化カルシウムおよび炭酸ナトリウムをモル比で1：0.3～1.0の場合には、製造直後の平均粒子径は、350から1500 nm程度のものであったが、これは微細なナノ粒子が凝集して、凝集塊としての大きな平均粒子径を有する値を示しているものであった。

この凝集塊は、超音波処理を施すことにより、凝集塊が個々の粒子に分散し、平均粒子径が100 nm程度の極めて均一なナノ粒子に分散した。

したがって、塩化カルシウムおよび炭酸ナトリウムをモル比で1：0～1.0で添加させ、超音波処理等の機械的振動を与えることにより、その平均粒子径が5～300 nmを有するレチノイン酸-CaCO₃ナノ粒子として調整されることが判明した。

なお、試験に使用したレチノイン酸-CaCO₃ナノ粒子は、凍結乾燥後のナノ粒子を注射用蒸留水で所定の濃度に再分散させ、使用した。

試験例2：レチノイン酸-ZnCO₃ナノ粒子の作製

レチノイン酸13.6 mgを900 μLのエタノールに溶解して、この溶液に0.5 N-NaOH水溶液の100 μLを加えた。このときのpHは、7～7.5であった。この溶液を母液として100 μL採取し、これをTween 80を含む蒸

留水 100 μ L に加え、よく攪拌した。

約 30 分後に、5 M-酢酸亜鉛含有水溶液を加え攪拌し、さらに 30 分後に 1 M-炭酸ナトリウム含有水溶液を加え、さらに攪拌した。一昼夜攪拌を継続した後、得られた溶液を一夜凍結乾燥し、目的とする炭酸亜鉛被覆レチノイン酸ナノ粒子（レチノイン酸-ZnCO₃ ナノ粒子）を作製した。

作製されたレチノイン酸-ZnCO₃ ナノ粒子の粒子径は、上記の試験例 1 と同様の粒度分布を有するのであった。

なお、試験に使用したレチノイン酸-ZnCO₃ ナノ粒子は、凍結乾燥後のナノ粒子を注射用蒸留水で所定の濃度に再分散させ、使用した。

10

試験例 3：レチノイン酸-CaPO₄ ナノ粒子の作製

レチノイン酸 13.6 mg を 900 μ L のエタノールに溶解して、この溶液に 0.5 N-NaOH 水溶液の 100 μ L を加えた。このときの pH は、7 ~ 7.5 であった。この溶液を母液として 100 μ L 採取し、これを Tween 80 を含む蒸留水 100 μ L に加え、よく攪拌した。

15

約 30 分後に、5 M-塩化カルシウム含有水溶液を加え攪拌し、さらに 30 分後に 1 M-リン酸ナトリウム含有水溶液を加え、さらに攪拌した。一昼夜攪拌を継続した後、得られた溶液を一夜凍結乾燥し、目的とするリン酸カルシウム被覆レチノイン酸ナノ粒子（レチノイン酸-CaPO₄ ナノ粒子）を作製した。

20

作製されたレチノイン酸-CaPO₄ ナノ粒子の粒子径も、上記の試験例 1 と同様の粒度分布を示すものであった。

以上のようにして調製された、本発明が提供する多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子の薬理作用の確認と、その粒子径が及ぼす薬理効果を確認するために、以下の生物学的試験を行った。

25

試験例 4：in vitro 実験-レチノイン酸-CaCO₃ ナノ粒子の B16 melanoma 細胞への添加実験

レチノイン酸が、B16 melanoma 細胞に対して増殖抑制効果があることはよく知

られている。本試験例により本発明が提供するレチノイン酸-CaCO₃ナノ粒子であっても、その B16 melanoma 細胞に対して増殖抑制効果があるかどうか、またその効果は、ナノ粒子化しないレチノイン酸単独に比較して、どのように効果的なものであるかを検討するため、以下の試験を行った。

5 (方法)

B16 melanoma 細胞 (2×10^4) を 24 時間培養した。その後、レチノイン酸および上記のレチノイン酸-CaCO₃ナノ粒子を、培地に添加した。その後さらに 48 時間培養を行い、³H-チミジン (³H-thymidine) の取り込み量を測定し、B16 melanoma 細胞の DNA 合成能を比較した。

10 (結果)

その結果を第 1 図に示した。図中に示した結果からも判明するように、本発明のレチノイン酸-CaCO₃ナノ粒子は、その添加量の増加にしたがって、ナノ粒子化しないレチノイン酸単独添加よりも、高い増殖抑制効果を示すことが理解される。

15 したがって、レチノイン酸をナノ粒子化した本発明のレチノイン酸-CaCO₃ナノ粒子は、B16 melanoma 細胞に対して極めて効果的に増殖抑制効果を発揮するものであることが判明した。

試験例 5 : *in vivo* 実験—ラットに皮下投与した場合の血中動態試験

20 (1) 皮下投与の場合

(方法)

Wistar 系ラット (7 週齢/雄性) を使用し、ラットの皮下にトリチウム (³H) ラベルのレチノイン酸およびトリチウム (³H) ラベルのレチノイン酸のミセルから得たレチノイン酸-CaCO₃ナノ粒子を投与した。その後時間ごとに血液を採取し、血中のレチノイン酸の量を、シンチレーションカウンターにて測定した。

25 なお、試験には、レチノイン酸ミセルに対して、塩化カルシウムおよび炭酸ナトリウムをモル比で 1 : 1.0 の比率で添加することにより得たレチノイン酸-CaCO₃ナノ粒子 (平均粒子径 : 150 nm) を使用した。

また、比較例としてのレチノイン酸は、ナノ粒子化していない、レチノイン酸

ミセルとして投与した。

(結果)

第2図に、レチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子（平均粒子径：150 nm）を皮下
投与した場合の結果を、比較例であるナノ粒子化しないレチノイン酸ミセルの場
5 合と比較して示した。

図中の結果からも判明するように、比較例であるナノ粒子化しないレチノイン
酸ミセルの場合には、投与後約1時間でレチノイン酸が血中に放出されてしまう
のに対して、レチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子の場合は、初期血中濃度が抑えられ
ると共に、持続的であり、レチノイン酸のナノ粒子からの放出は約7日間継続し
10 ていた。

以上の結果から、レチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子は、レチノイン酸の徐放化効
果が顕著に認められており、徐放化製剤として極めて有効なものであることが確
認された。

また、第3図および第4図に投与10日後の投与皮下部位の写真を示した。第
15 3図は比較例であるナノ粒子化しないレチノイン酸ミセルを投与した場合の写真
であり、第4図はレチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子を投与した場合の写真である。
レチノイン酸ミセルを投与した場合には、レチノイン酸の刺激性により投与部位
で炎症を起しているが、レチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子を投与した場合には、レ
チノイン酸の刺激性が緩和されており、その結果炎症を全く惹起していないもの
20 であった。

以上の結果から、本発明の有効成分であるレチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子は皮
膚刺激性が低く、外用製剤として皮膚投与、あるいは化粧品として、安全に皮膚
への適用をし得るものであることが判明した。

(2) 皮膚投与（塗布）の場合

25 マウス（ddY系、5週齢／雄性）を使用し、マウスの背部を電気バリカンにて
剪毛して、上記で得たトリチウム（ ^3H ）ラベルのレチノイン酸およびトリチウ
ム（ ^3H ）ラベルのレチノイン酸のミセルから得たレチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子
およびレチノイン酸- ZnCO_3 ナノ粒子を、ワセリン基剤に混合し、皮膚に塗布し
た。その後時間ごとに血液を採取し、血中のレチノイン酸の量を、シンチレーシ

ョンカウンターにて測定した。

試験に供した試料は、以下のものである。

(a) レチノイン酸-CaCO₃ ナノ粒子 (平均粒子径：約 20 nm)。

(b) レチノイン酸-ZnCO₃ ナノ粒子 (平均粒子径：約 20 nm)。

- 5 また、比較例としてのレチノイン酸は、ナノ粒子化していない、レチノイン酸そのものをワセリン基剤と混合して使用した。

(結果)

- 第5図に、その結果を示した。レチノイン酸-CaCO₃ ナノ粒子 [RA-CaCO₃] (粒子径：約 20 nm) およびレチノイン酸-ZnCO₃ ナノ粒子 [RA-ZnCO₃] (粒子径：約 20 nm) ワセリン基剤に混合して皮膚塗布投与した場合、ナノ粒子化していないレチノイン酸に比較して、レチノイン酸の血中濃度は顕著に高いものであった。
- 10

- したがって、本発明の有効成分である多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子は、その平均粒子径を調整し、特に微細なナノ粒子とすることにより、より効果的にレチノイン酸の薬理効果を発揮し得るものとなることが判明した。
- 15

試験例 6 : *in vivo* 実験 HB-EGF mRNA 産生試験 (マウス)

(方法)

- マウス (ddY 系、5 週齢/雄性) の耳介に、レチノイン酸含有ワセリン基剤製剤 (レチノイン酸として 0.1%) を、1 日 30 mg/耳介塗布し、連続 4 日間に渡り塗布を行った。5 日目に耳を切除し、RNA を抽出し、real-time PCR 法により、HB-EGF mRNA を測定した。
- 20

- なお、同時に House-keeping gene として GAPDH (リン酸グリセルアルデヒド脱水素酵素 : glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) mRNA も合成および測定し、相対値として定量した。
- 25

使用したレチノイン酸としては、以下のものである。

(a) レチノイン酸-CaCO₃ ナノ粒子 (平均粒子径：約 20 nm)。

(b) レチノイン酸-ZnCO₃ ナノ粒子 (平均粒子径：約 20 nm)。

(c) レチノイン酸単独。

(結果)

その結果を第6図に示した。図中に示した結果からも判明するように、本発明の粒径を調整して得たレチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子(平均粒子径:約20nm)およびレチノイン酸- ZnCO_3 ナノ粒子(平均粒子径:約20nm)は、レチノイ

5 ン酸単独よりも、有意にHB-EGF mRNAを産生していることが理解される。

HB-EGF mRNAは、上皮細胞の増殖因子であることより、この産生量を増大させることは本発明の多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子が皮膚再生能を、顕著に発揮している事実を示すものである。

10 試験例7：in vivo実験—皮膚投与における表皮細胞の増殖効果(マウス)

(方法)

マウス(ddy系、5週齢/雄性)を使用し、マウスの背部を電気バリカンにて剪毛して、レチノイン酸含有ワセリン基剤製剤(レチノイン酸として0.1%製剤)を、1日10mg/cm²量塗布し、連続4日間に渡り塗布を行った。4日

15 目に塗布部の表皮の厚さを測定した。

使用したレチノイン酸としては、以下のものである。

(a) レチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子(平均粒子径:約20nm)。

(b) レチノイン酸- ZnCO_3 ナノ粒子(平均粒子径:約20nm)。

(c) 塩化カルシウムのみをレチノイン酸ミセルに添加することにより得た、ミセル表面をカルシウムで被覆したレチノイン酸-Caナノ粒子(平均粒子径:約20nm)。

(d) 塩化亜鉛のみをレチノイン酸ミセルに添加することにより得た、ミセル表面を亜鉛で被覆したレチノイン酸-Znナノ粒子(平均粒子径:約20nm)。

(e) レチノイン酸単独。

25 なお、コントロールとして無処理群および基剤としてのワセリンのみ塗布群をおいた。

(結果)

その結果を第7図に示した。図中の結果からも明らかなように、本発明の有効成分であるレチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子およびレチノイン酸- ZnCO_3 ナノ粒子

は、レチノイン酸含有製剤に比較して有意に表皮細胞を増殖させ、表皮の厚みが顕著に増大していることが理解される。

なお、塩化カルシウムのみをレチノイン酸ミセルに添加することにより得た、ミセル表面をカルシウムで被覆したレチノイン酸-Ca ナノ粒子 [RA-Ca] および
5 塩化亜鉛のみをレチノイン酸ミセルに添加することにより得た、ミセル表面を亜鉛で被覆したレチノイン酸-Zn ナノ粒子 [RA-Zn] も、レチノイン酸単独に比較して表皮の厚みが増大している。このことは、レチノイン酸をミセルとして形成させ、金属ハロゲン化物または酢酸化物により安定化させたものにも、レチノイン酸含有製剤に比較して有意に表皮細胞増殖効果が認められることを示すもので
10 あり、本発明の一部を構成するものである。

皮膚組織のHE染色結果の写真を第8図～第13図に示した。

第8図はコントロールとして無処理群、第9図はレチノイン酸単独含有製剤投与群、第10図はレチノイン酸-CaCO₃ナノ粒子含有製剤投与群、第11図はレチノイン酸-ZnCO₃ナノ粒子含有製剤投与群、第12図はレチノイン酸-Ca ナノ
15 粒子含有製剤投与群、第13図はレチノイン酸-Zn ナノ粒子含有製剤投与群の結果である。写真において紫色に染色されている部分が表皮に相当する。

本発明の本発明の多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子含有製剤を塗布した場合には、コントロールおよびレチノイン酸単独含有製剤塗布に比較して表皮の再生が顕著なものであることが理解される。

20 また、皮膚のコロイド鉄染色の写真を第14図および第15図に示した。

第14図はレチノイン酸単独含有製剤投与群の、第15図はレチノイン酸-CaCO₃ナノ粒子含有製剤投与群の結果である。写真において、濃青の部分はヒアルロン酸に相当し、レチノイン酸含有製剤塗布に比較して、本発明のレチノイン酸-CaCO₃ナノ粒子含有製剤を塗布した場合には、ヒアルロン酸が表皮内の基底
25 細胞・有棘細胞間に産生されていることが判明する。このことは、本発明のレチノイン酸-CaCO₃ナノ粒子を経皮投与することで、表皮内では通常短時間で産生されないヒアルロン酸の産生が短時間のうちに誘導されていることを示すものである。

試験例 8 : *in vivo* 実験－皮膚投与におけるシワ取り効果（ヘアレスマウス）（方法）

ヘアレスマウス（18週齢／雄性）のシワが多く認められる首部に、本発明の
レチノイン酸－CaCO₃ナノ粒子（平均粒子径：20 nm）含有のワセリン基剤製
5 剤（レチノイン酸として0.1%製剤）を、1日30 mg／首部量塗布し、連続
4日間にわたり塗布を行った。4日目にそのシワの消失程度を観察した。

対照として、レチノイン酸単独含有製剤塗布した場合をおいた。

（結果）

その結果を、第16図および第17図に示した。第16図の写真は投与開始前
10 の首部の写真であり、第17図の写真の上は、レチノイン酸単独含有製剤を塗布
した場合、下は本発明のレチノイン酸－CaCO₃ナノ粒子含有製剤を塗布した場合
の結果である。これらの対比から明らかなように、本発明の製剤を塗布したこと
により、首部に認められていた深い皮溝が消失し、肌が滑らかなものとなってい
ることが理解される。

15

試験例 9 : 製剤の貯蔵安定性試験

本発明の有効成分であるレチノイン酸－CaCO₃ナノ粒子（平均粒子径：20 nm）
m）を含有する製剤の貯蔵安定性について、水を媒体とした製剤（レチノイン酸
として0.1%製剤）およびワセリン基剤製剤（レチノイン酸として0.1%製
20 剤）を、37℃にて保存し、レチノイン酸の分解の程度を試験した。

なお、対照としてレチノイン酸のワセリン基剤製剤（レチノイン酸として0.1%製剤）をおいた。

保存開始後、10、24および46日目に各製剤中のレチノイン酸の安定性を
分光光度計で検出される極大吸収（340 nm）の吸収強度の変化で検討した。

25 （結果）

その結果を第18図～第20図として示した。

第18図はレチノイン酸単独含有製剤における極大吸収の変化を示したもので
あり、第19図は本発明の有効成分であるレチノイン酸－CaCO₃ナノ粒子水媒体
製剤における極大吸収の変化を示したものであり、第20図は本発明の有効成分

であるレチノイン酸-CaCO₃ナノ粒子ワセリン基剤製剤における極大吸収の変化を示したものである。

三者の比較からも明らかなように、本発明の製剤は、レチノイン酸の安定性が極めて優れているものであることが理解される。

5

以下に、本発明が提供する多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子を使用した製剤例を例示する。なお、本発明はこれらの製剤例に限定されるものではないことはいうまでもない。

10 なお、なお、下記製剤例に使用した多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子は、凍結乾燥後のナノ粒子を、蒸留水でにより所定量となる濃度に再分散させて使用した。

製剤例 1：外用軟膏剤／ハイドロゲル剤

15 レチノイン酸-CaCO₃ナノ粒子（平均粒子径：約 20 nm）、白色ワセリン、カルボキシメチルセルロースおよびパラオキシ安息香酸メチルの適量を取り、全体が均質になるまで混和し、レチノイン酸が 0.3% 含有の軟膏剤およびハイドロゲル剤を得た。

製剤例 2：外用貼付剤（水性パップ剤）

（処方）

20	レチノイン酸-CaCO ₃ ナノ粒子	
	（または、レチノイン酸-ZnCO ₃ ナノ粒子）	0.1 重量%
	ポリアクリル酸	2.0 重量%
	ポリアクリル酸ナトリウム	5.0 重量%
	カルボキシメチルセルロースナトリウム	2.0 重量%
25	ゼラチン	2.0 重量%
	ポリビニルアルコール	0.5 重量%
	グリセリン	25.0 重量%
	カオリン	1.0 重量%
	水酸化ナトリウム	0.6 重量%

酒石酸	0.3重量%
EDTA-2-ナトリウム	0.1重量%
精製水	残部

上記配合成分により、常法にしたがって外用貼付剤（水性パップ剤）を得た。

5

製剤例3：化粧用クリーム

カルボキシビニルポリマー1部を精製水89部に溶解させ、これに水酸化カリウム0.4部を精製水9.6部に溶解させたものを加え、カルボキシビニルポリマーのアルカリ中和水性ゲルを100部得た。

10 次いで、上記で得た水性ゲルを使用し、以下の処方により、常法にしたがって化粧用クリームを得た。

	レチノイン酸-CaCO ₃ ナノ粒子	0.1部
	上記で得た水性ゲル	30部
	流動パラフィン	10部
15	グリセリン	22.7部
	パラオキシ安息香酸メチル	0.3部
	ステアリン酸	10部
	香料	適量
	精製水	残部

20

製剤例4：化粧用乳液

(処方)

	セチルアルコール	1.5部
	ワセリン	5.0部
25	流動パラフィン	10.0部
	ポリオキシエチレン(10)ソルビタンモノステアレート	10.0部
	ポリエチレングリコール(1500)	3.0部
	トリエタノールアミン	1.0部
	酢酸トコフェロール	0.2部

レチノイン酸-CaCO ₃ ナノ粒子	
(または、レチノイン酸-ZnCO ₃ ナノ粒子)	0.05部
亜硫酸水素ナトリウム	0.01部
カルボキシビニルポリマー (商品名; ハイビスワコー)	0.05部
5 メチルパラベン	適量
香料	適量
精製水	残余

(製法)

- 少量の精製水にカルボキシビニルポリマーを溶解する(A液)。残りの精製水に
- 10 ポリエチレングリコールとレチノイン酸-CaCO₃ナノ粒子 (または、レチノイン酸-ZnCO₃ナノ粒子) およびトリエタノールアミンを加え溶解し、加熱して70℃に保った(水相)。別に残りの成分を加熱溶解して、70℃に保った(油相)。水相に油相を加え予備乳化し、次いでA液を加え、その温度のままホモミキサーで均一に乳化させて、乳化後よく攪拌しながら冷却し、化粧用乳液を得た。

15

産業上の利用可能性

- 以上説明したように、本発明により、レチノイン酸のミセル表面を多価金属無機塩の皮膜で被覆してなるナノ粒子を有効成分として含有する組成物が提供される。本発明の有効成分である多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子は、水に
- 20 溶解した場合には透明溶液の形態を保っているため、皮下および静脈内注射製剤として投与することが可能となる。また、多価金属無機塩の皮膜によりレチノイン酸が被覆されていることから低刺激性であり、投与部位における炎症の発生、腫瘍化などがみられない特性を有している。

- したがって、本発明が提供する多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子は、
- 25 レチノイン酸の薬理効果を有効に発揮し得るものであって、経口投与製剤、非経口投与製剤、外用剤あるいは化粧料への応用として極めて有効なものであり、その産業上の貢献度は多大なものである。

請求の範囲

1. 有効成分として、レチノイン酸のミセル表面を多価金属無機塩で被覆してなる平均粒子径が5～300 nmを有する多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子を含有することを特徴とする組成物。
5
2. 有効成分である多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子における多価金属無機塩の皮膜が、炭酸カルシウム、炭酸亜鉛またはリン酸カルシウムである請求の範囲第1項に記載する組成物。
3. 有効成分である多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子が、レチノイン酸
10 の低級アルコール溶液をアルカリ水溶液と共に分散し、さらに非イオン性界面活性剤を添加することにより調製した混合ミセルに、2価金属ハロゲン化物または酢酸化物およびアルカリ金属炭酸化物またはリン酸化物を、モル比で1：0～1.0の範囲内で添加することによりミセル表面に多価金属無機塩の皮膜を形成し、その平均粒子径を5～300 nmの範囲内に調整することにより得
15 られたものである請求の範囲第1または2項に記載する組成物。
4. 有効成分が、平均粒子径が5～300 nmを有する炭酸カルシウム被覆レチノイン酸ナノ粒子である請求の範囲第1、2または3項に記載する組成物。
5. 有効成分が、平均粒子径が5～300 nmを有する炭酸亜鉛被覆レチノイン酸ナノ粒子である請求の範囲第1、2または3項に記載する組成物。
- 20 6. 有効成分が、平均粒子径が5～300 nmを有するリン酸カルシウム被覆レチノイン酸ナノ粒子である請求の範囲第1、2または3項に記載する組成物。
7. 組成物が、経口投与製剤、非経口投与製剤、外用製剤、化粧品である請求の範囲第1ないし6項のいずれかに記載する組成物。
8. 組成物が、徐放性である請求の範囲第7項に記載する組成物。
- 25 9. 有効成分として、平均粒子径が5～300 nmを有する炭酸カルシウム被覆レチノイン酸ナノ粒子を含有することを特徴とする徐放製剤。
10. 有効成分として、平均粒子径が5～300 nmを有する炭酸カルシウム被覆レチノイン酸ナノ粒子を含有することを特徴とする外用剤。
11. 平均粒子径が5～300 nmを有する炭酸カルシウム被覆レチノイン酸ナノ

ノ粒子を配合してなる化粧品。

1 2. 有効成分として、平均粒子径が5～300nmを有する炭酸亜鉛被覆レチノイン酸ナノ粒子を含有することを特徴とする徐放製剤。

5 1 3. 有効成分として、平均粒子径が5～300nmを有する炭酸亜鉛被覆レチノイン酸ナノ粒子を含有することを特徴とする外用剤。

1 4. 平均粒子径が5～300nmを有する炭酸亜鉛被覆レチノイン酸ナノ粒子を配合してなる化粧品。

1 5. 有効成分として、平均粒子径が5～300nmを有するリン酸カルシウム被覆レチノイン酸ナノ粒子を含有することを特徴とする徐放製剤。

10 1 6. 有効成分として、平均粒子径が5～300nmを有するリン酸カルシウム被覆レチノイン酸ナノ粒子を含有することを特徴とする外用剤。

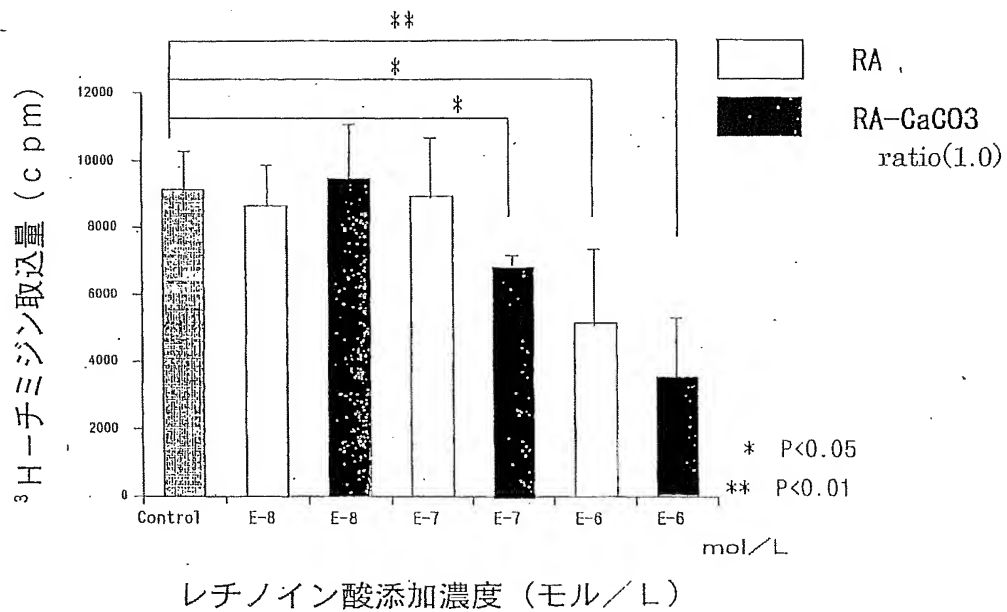
1 7. 平均粒子径が5～300nmを有するリン酸カルシウム被覆レチノイン酸ナノ粒子を配合してなる化粧品。

15

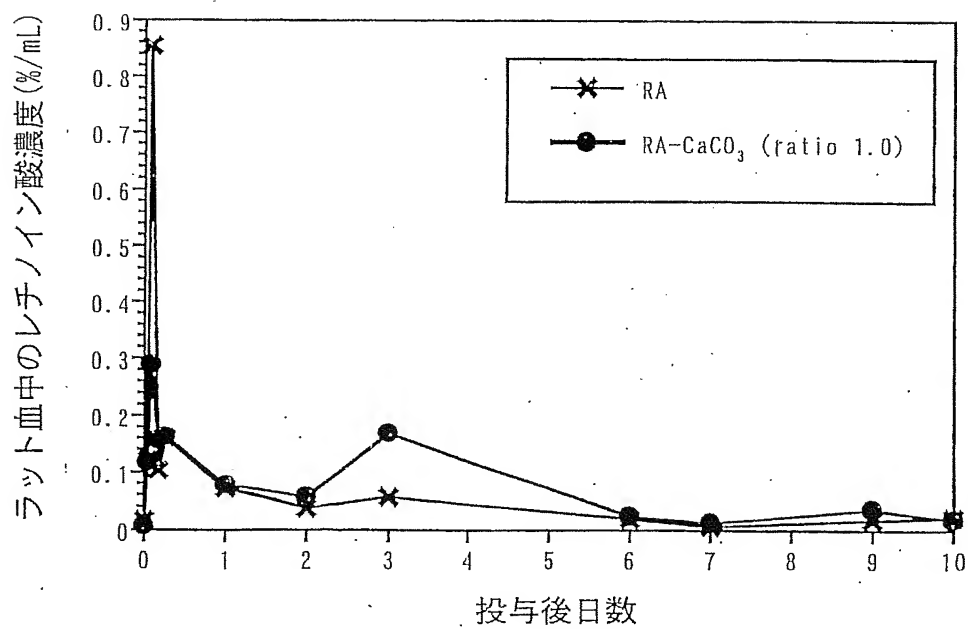
20

1 / 12

第1図

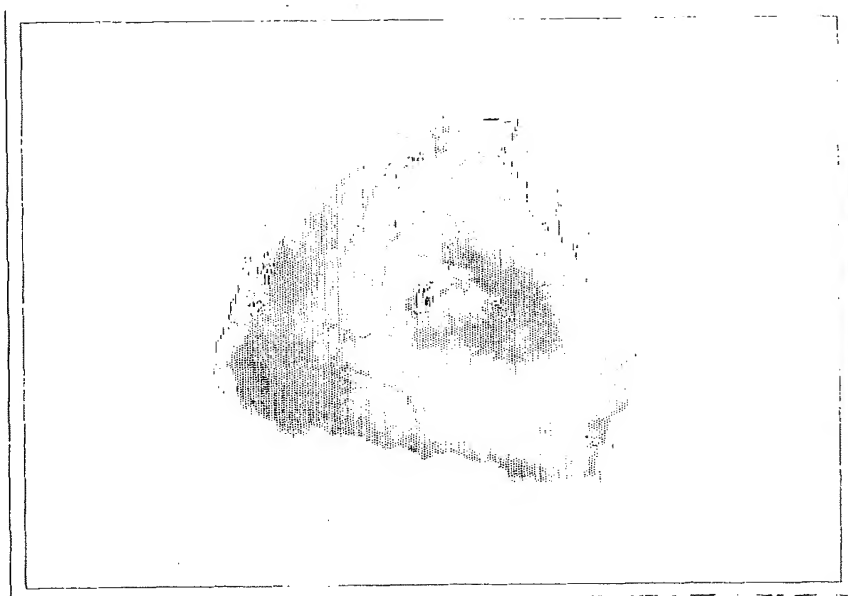


第2図

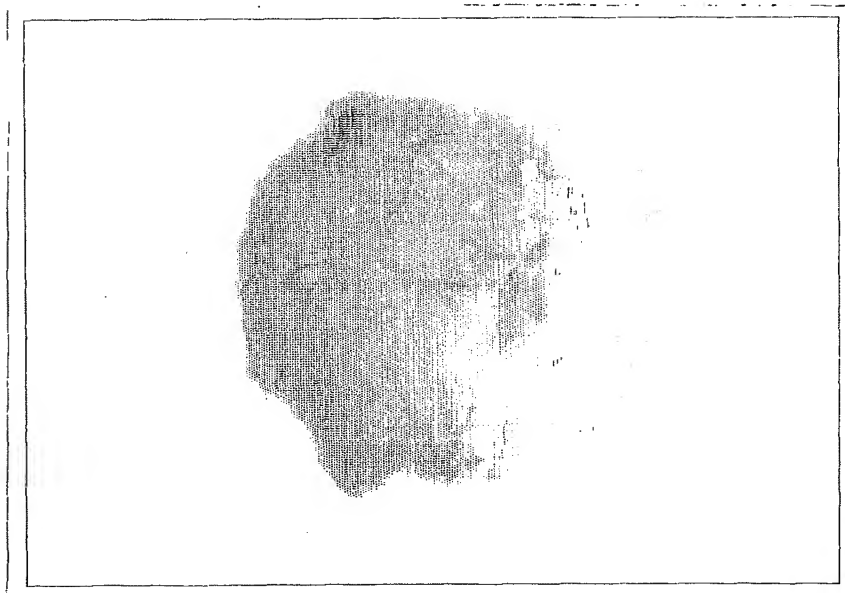


2 / 1 2

第3図

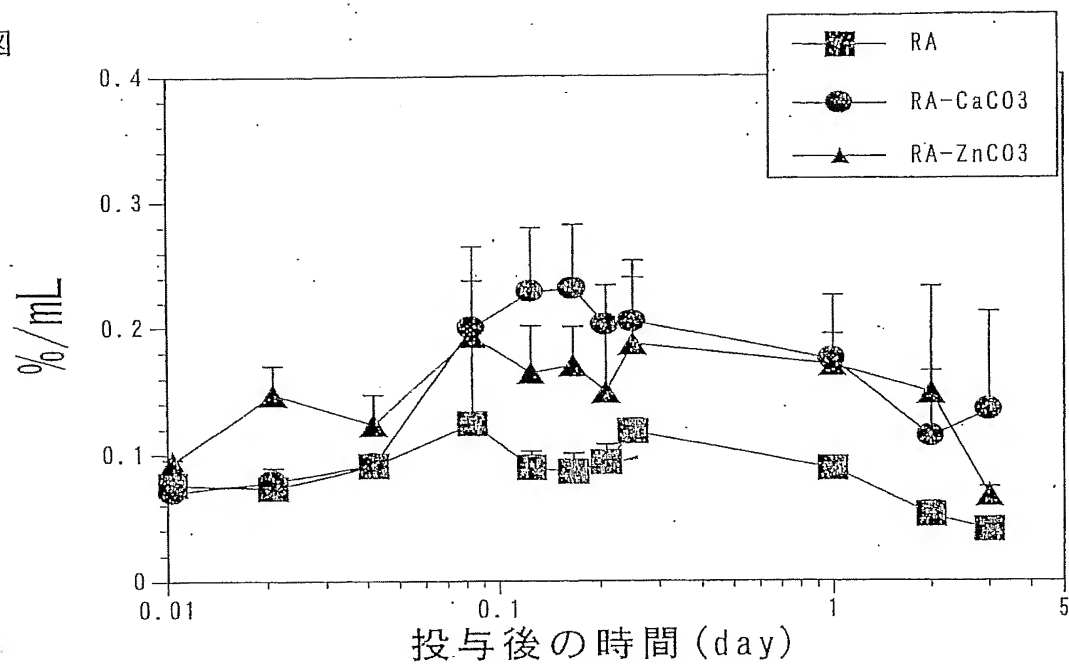


第4図

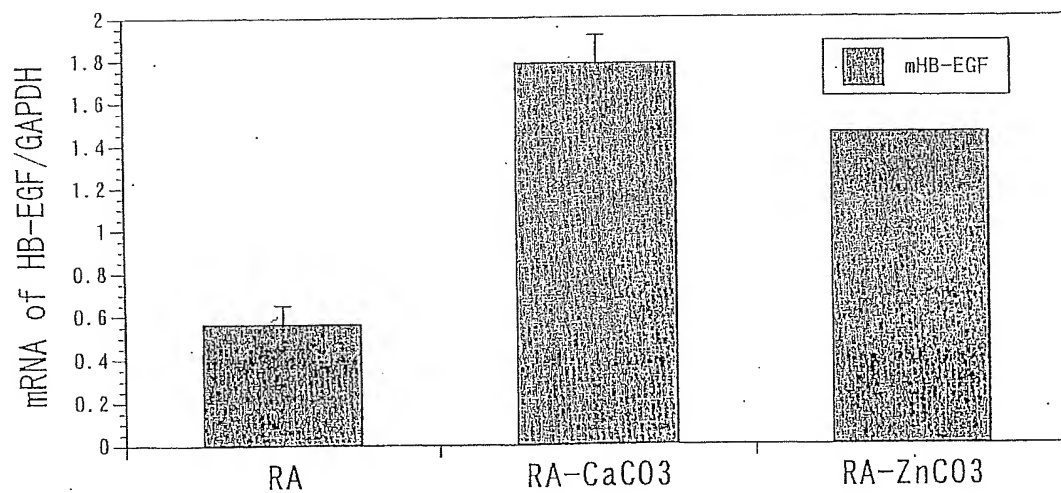


3 / 1 2

第5図

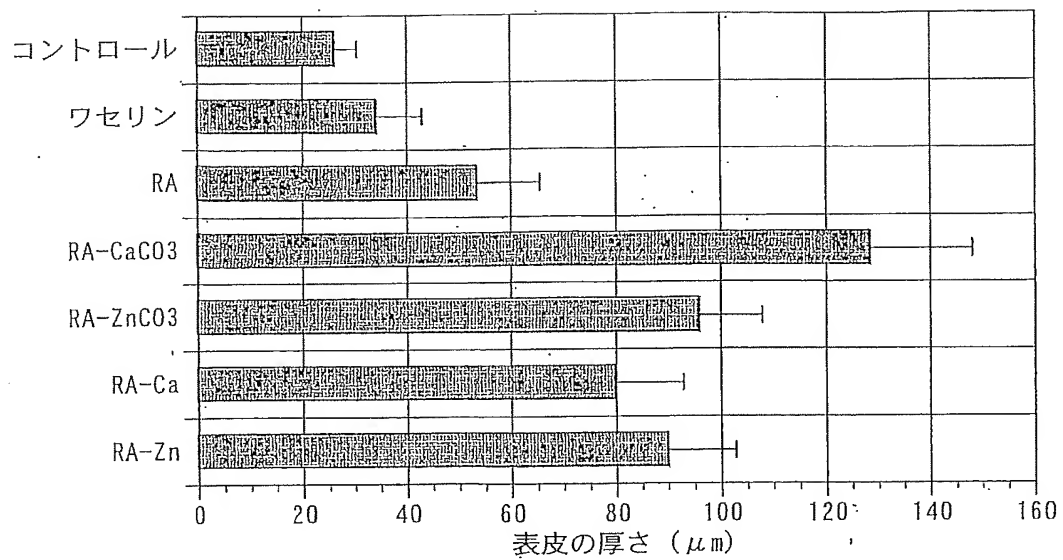


第6図



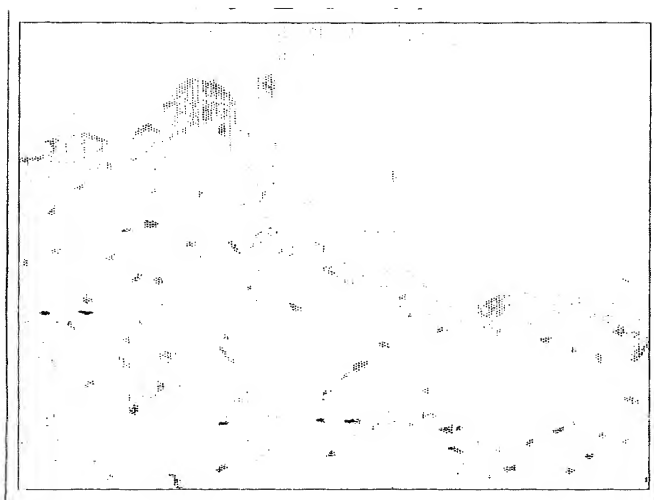
4 / 1 2

第7図

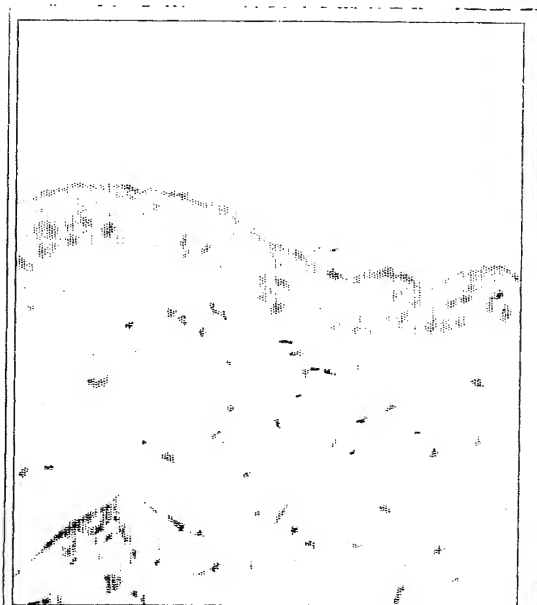


5 / 12

第 8 図

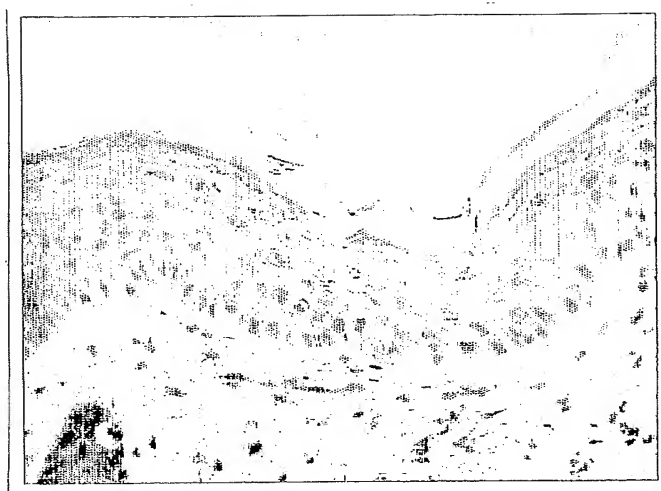


第 9 図

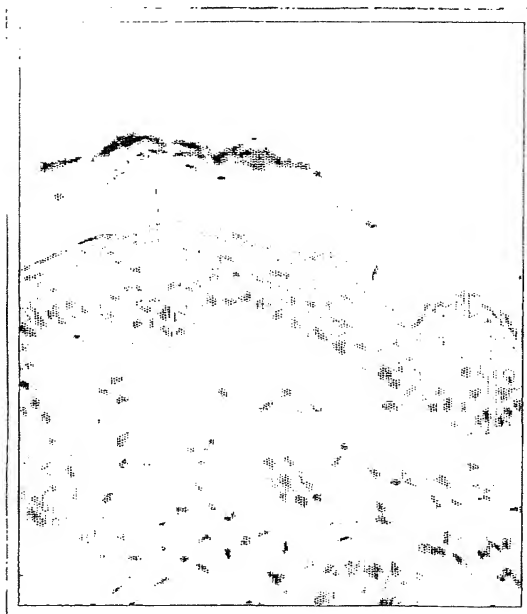


6 / 12

第 10 図

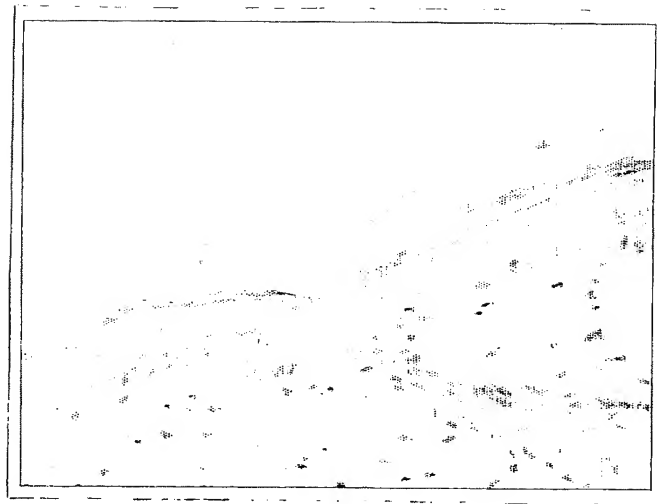


第 11 図

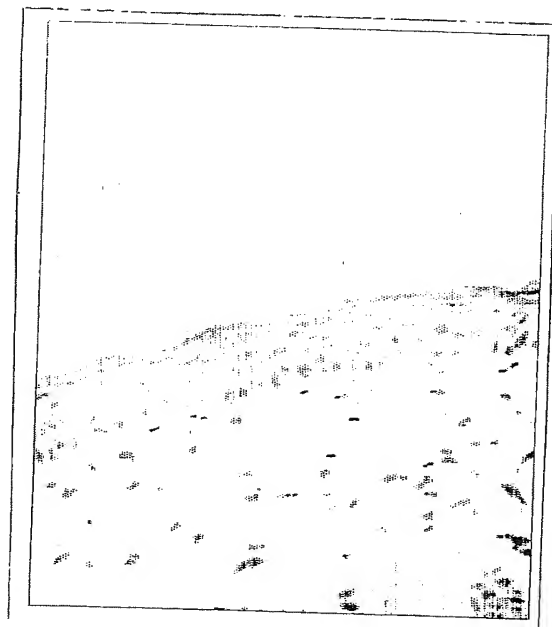


7 / 12

第12図

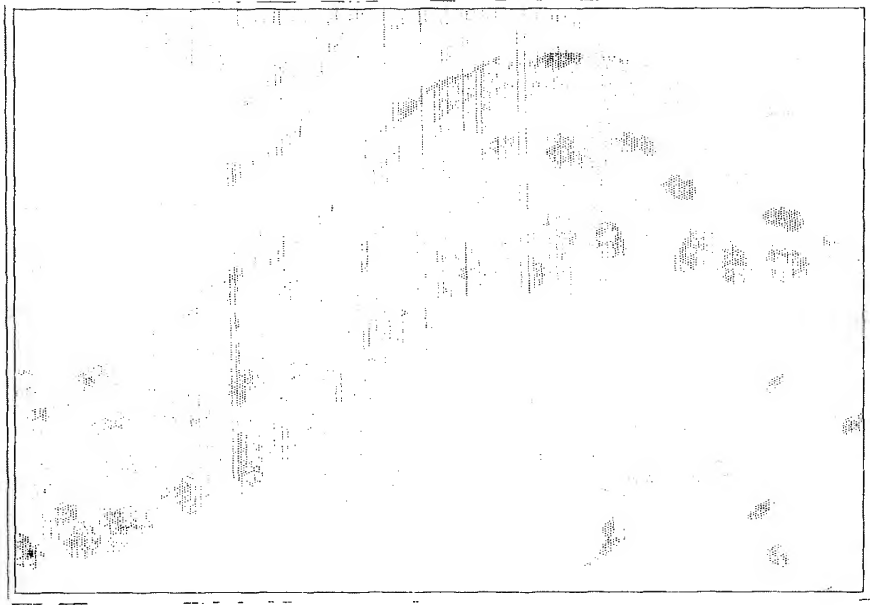


第13図

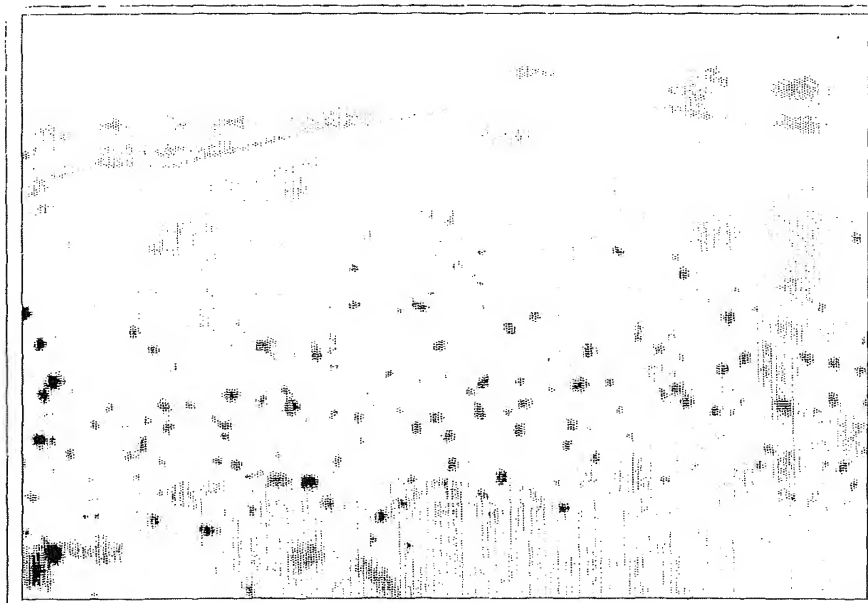


8 / 12

第14図

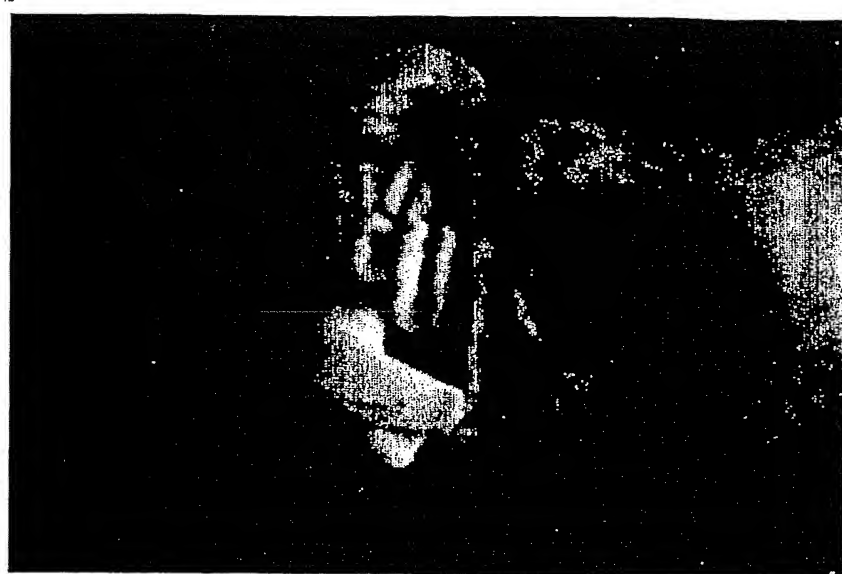


第15図



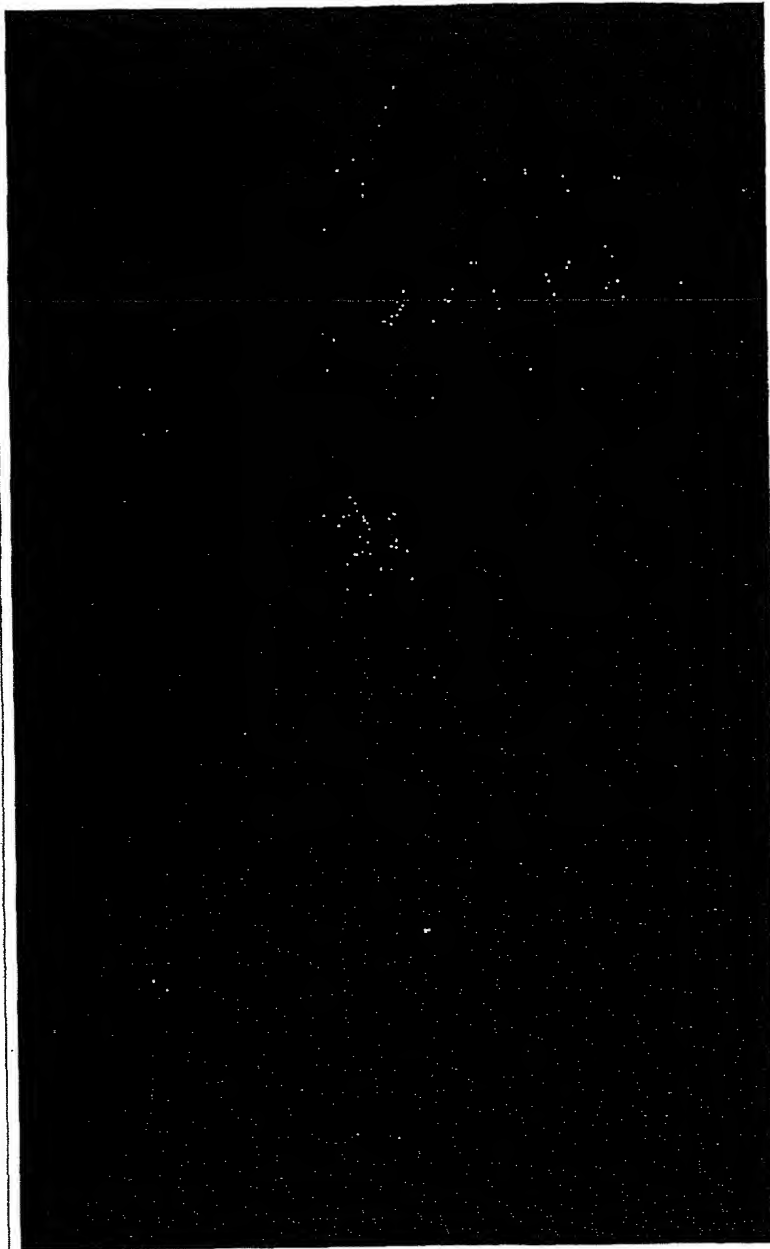
9 / 12

第16図



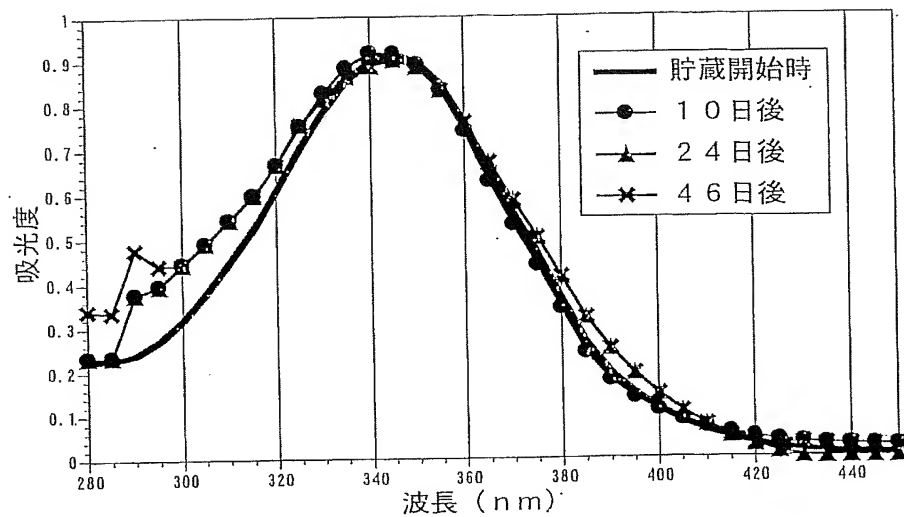
10 / 12

第17図

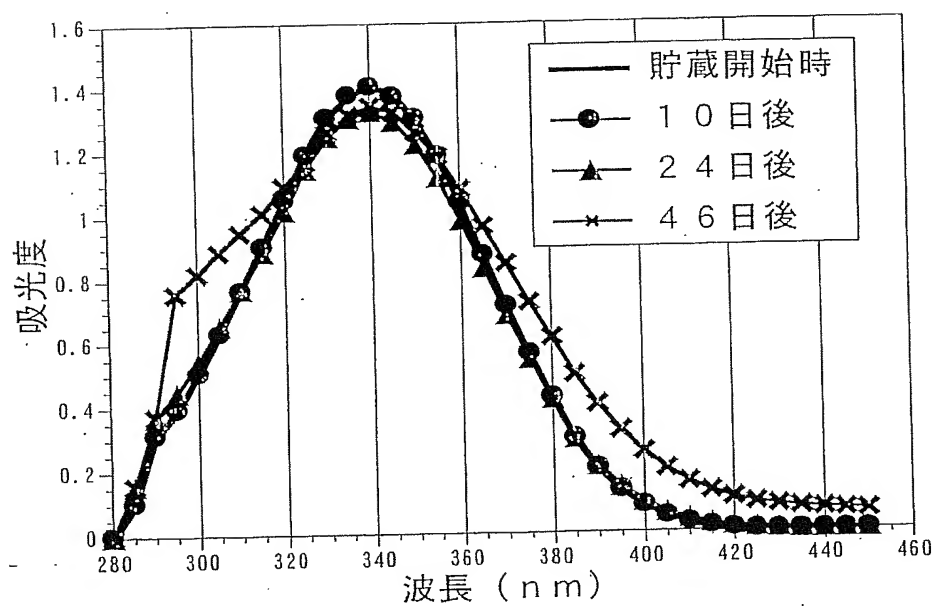


11 / 12

第18図

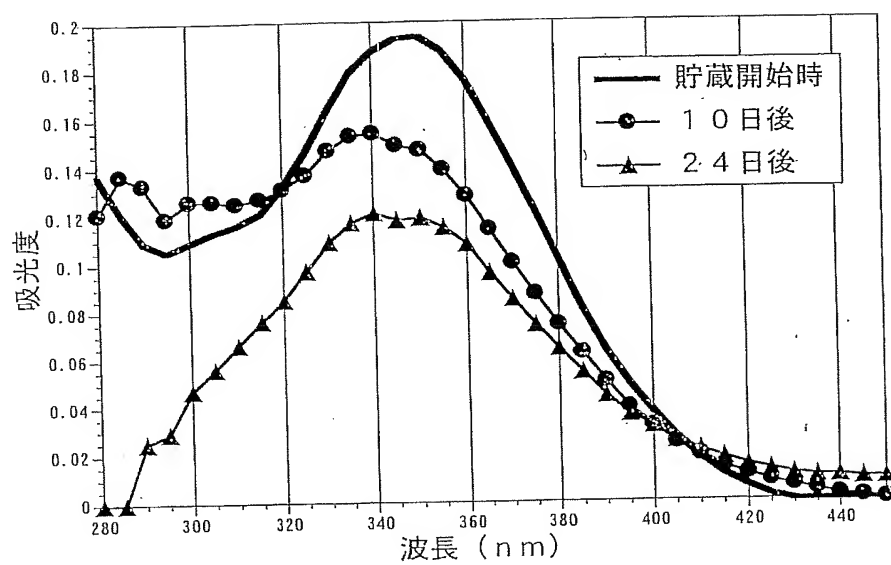


第19図



12/12

第20図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/13181

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K31/203, 9/51, 9/06, 9/70, 7/00, 7/48, A61P17/00, 3/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K31/203, 9/51, 9/06, 9/70, 7/00, 7/48, A61P17/00, 3/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Yoko YAMAGUCHI, Rie IGARASHI, 'Retinoic Acid	1, 7, 8
Y	Koshitsu Nano Particle no Hifu Saisei eno Kokoromi', Drug Delivery System (DDS), 2003, Vol.18, No.3, May, page 221	2-6, 9-17
Y	WO 93/15720 A1 (VESTAR INC.), 19 August, 1993 (19.08.93), In particular, page 3, line 6 to page 4, line 19 & JP 6-506460 A In particular, page 3, upper right column, line 8 to lower left column, line 19	2-6, 9-17
Y	WO 01/052817 A2 (BIODELIVERY SCIENCE INC.), 26 July, 2001 (26.07.01), Full text & JP 2003-529557 A Full text	2-6, 9-17

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing
date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means
"P" document published prior to the international filing date but later
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
04 December, 2003 (04.12.03)

Date of mailing of the international search report
24 December, 2003 (24.12.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ A61K31/203, 9/51, 9/06, 9/70, 7/00, 7/48,
A61P17/00, 3/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ A61K31/203, 9/51, 9/06, 9/70, 7/00, 7/48,
A61P17/00, 3/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	山口葉子、五十嵐理慧, 「レチノイン酸硬質ナノパーティクルの皮膚再生への試み」, Drug Delivery System (DDS), 2003, Vol.18, No.3 May, p221	1, 7, 8 2-6, 9-17
Y	WO 93/15720 A1 (VESTAR INC.) 1993.08.19, 特に第3頁第6行ー第4頁第19行 & JP 6-506460 A 特に第3頁右上欄第8行-左下欄第19行	2-6, 9-17 2-6, 9-17
Y	WO 01/052817 A2 (BIODELIVERY SCIENCE INC.) 2001.07.26 全文 & JP 2003-529557 A 全文	

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04.12.03

国際調査報告の発送日

24.12.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

安藤 倫世



4 P

3230

電話番号 03-3581-1101 内線 3492